

ÚJ DNS SZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK II.

Boros Imre

SZTE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék,

SZBK Biokémiai Intézet, Szeged

borosi@bio.u-szeged.hu

Az összefoglaló első része a DNS szekvenálási technikák fejlődését és az új generációs módszerek (NGS) legfontosabb jellemzőit tekintette át (lásd Biokémia XXXVIII. évfolyam 1. szám, 2014. március, 20-32. oldal). A mostani írás a leggyakrabban használt néhány „szekvenáló platform” és egy-két sikerrel kecsegtető új próbálkozás jellegzetességeit foglalja össze. Ezeket mint szintézissel, hibridizáció-ligálással és egyedi molekulák vizsgálatával szekvenciát meghatározó eljárások csoportosítom, megjegyezve, hogy egyesek besorolása ezek közül egynél több csoportba is helytálló lehet. Nem tárgyalom a szekvencia meghatározást bevezető és befejező eljárások kiterjedt témaköreit. Az elsőbe tartoznak mindazok a módszerek, amelyekkel a szekvenálandó nukleinsav mintát előállítják. Tekintettel, hogy ez archív anyag, formalinnal fixált és parafinba ágyazott metszet, friss szövetek és igen sokféle más forrásból is származhat és szelektálása, konverziója, dúsítása is több módon történhet, a téma önmagában is külön cikket igényelne. Hasonlóan terjedelmes lenne a szekvencia adatok feldolgozását érintő kérdések áttekintése is.

Szekvenálás szintézissel

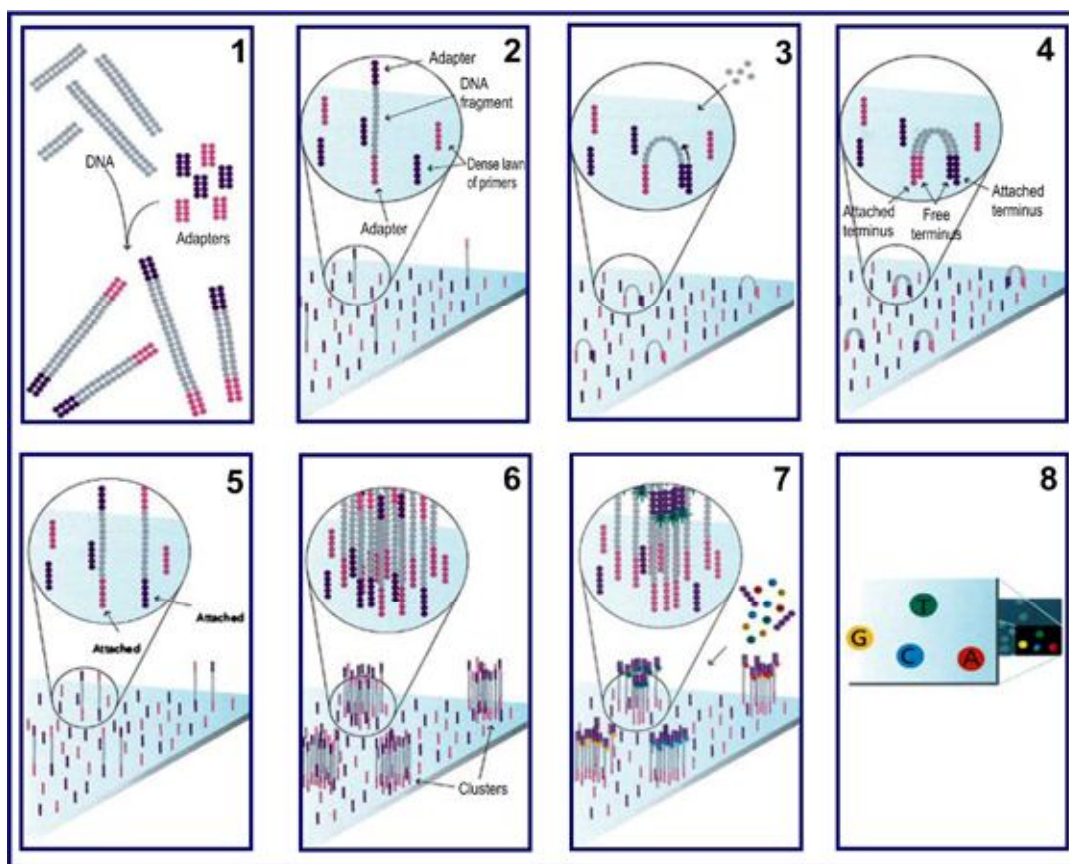
A szintézissel megvalósított szekvenálásokban a vizsgált DNS az egyesszálú templát, ami alapján DNS polimeráz épít komplementer szálát. A szintézis követése a foszfodiészter kötés kialakításakor képződő valamelyik ion (pirofoszfát vagy proton) kimutatása vagy a nukleotid beépüléssel járó fluoreszcencia jel változás mérése alapján történik. A szintézissel megvalósított szekvenálások variációi többek között abban különböznek, hogy vannak-e blokkoló csoportok a beépítésre kerülő nukleotidokon és hogy az egyes nukleotidok fluoreszkáló jelzései eltérőek-e vagy azonosak.

Piroszekvenálás

Az első kereskedelmi sikeres NGS készülék a piroszekvenálás módszert alkalmazó Life Sciences 454 GS volt. Ennek továbbfejlesztett változata a 2008-ban bevezetett Roche GS FLX Titanium és ezt a módszert használja a Roche benchtop készüléke, a GS Junior is. A piroszekvenálás során DNS polimerázzal végzett nukleotid beépítéskor felszabaduló pirofoszfát hasítása hajtja az ATP szintézist

adenozin-5'-foszfoszulfátból (APS), az ATP-t pedig luciferáz használja és a luciferin-oxyluciferin átalakulást katalizálva fényfelvillanást okoz. A szekvenáláshoz használt könyvtár készítéséhez a feldarabolt minta-fragmentumokhoz adaptort ligálnak, majd a fragmentumokat agaróz szemcsékhez kapcsolják. A szemcsék felszínükön az adattorral komplementer oligot tartalmaznak. A minta hígításával biztosítják, hogy szemcsénként átlagosan csak egy-egy fragmentum kötődjön az adaptor és a szemcse felületéhez rögzített komplementer oligonukleotid hibridizációjával. A szemcséken kötött fragmentumokat ezt követően emulziós PCR reakcióban amplifikálják. Az emulzió képzésénél is fontos, hogy egy-egy csepp csak egy-egy szemcsét tartalmazzon. A reakciókat követően a fragmentumok milliányi másolatait tartalmazó szemcséket, és kisebb szemcsék felületére kapcsolva a reakcióhoz szükséges enzimeket, ún. pikotiter lemez (PTP) lyukaiba helyezik. A szekvenáló készülékben a pikotiter lemezt optikai vezető üvegszálakra helyezik, olyan elrendezésben, hogy az egyes lyukakból a fényfelvillanások külön-külön rögzíthetők az optikai vezető másik végéhez kapcsolt CCD kamerával. A DNS szintézishez lánckezdő oligonukleotidot (primer), polimerázt és a 3'-OH-n védőcsoportot nem tartalmazó prekursorokat adnak a szemcsékhez. A PTP felületén egyenként folytatják át a nukleozid-trifoszfátokat, ahonnan azok diffúzióval jutnak be az agaróz szemcsék közé. Fényfelvillanás jelzi, hogy melyik nukleotidnál történt beépülés és a felvillanások a helyzeti információ alapján egy-egy fragmentumhoz rendelhetők. A fényfelvillanás intenzitása arányos a beépült nukleotidok számával. Az egyes szemcséken eltérő számban képződött templát szám okozta intenzitás eltérések kompenzálásához az adaptor elejének szekvenciája alapján a rendszer kalibrálja, hogy mekkora az egy nukleotid beépítése okozta fényintenzitás. Homopolimer részek szintézisekor hibát okozhat azonban, hogy a több azonos nukleotid beépülésekor az érzékelő telítődik, illetve a jel intenzitás nem arányos a beépülések számával. A nukleotid azonosítás, „base-calling” során a rendszer a felvillanás sorozatokat nukleotid sorrendekké alakítja, több minőségi ellenőrzést elvégezve. A piroszekvenálást használó eszközök erőssége, hogy hosszú leolvasásokat tesznek lehetővé. Hátrányuk a viszonylag magas költség és korlátozott teljesítmény.

Szekvenálás ciklikusan ismételt (megfordítható) láncterminációval (cyclic reversible termination)



1. ábra. Az Illumina szekvenálás szintézissel módszer a cég által készített ismertető szerinti lépésekben (1-8) összefoglalva. Fontos kiemelni, hogy a különböző minták DNS (DNA) fragmentumai az adapterekbe épített „vonalkód” nukleotid részletek alapján a könyvtárak elkészítését követően keveredhetnek és együtt kezelhetők. A vázlat az egyes lépések részletezését tekintve nagyvonalú, pl. a 2. mezőben bemutatott állapot (az átfolyó cella felületén kovalensen rögzített ss templát fragmentumok) eléréséhez a következő lépésekre van szükség: (a) ssDNS fragmentumok kapcsolása adaptor régiók hibridizációjával a cella felületen, (b) komplementer szál szintézise a cella felületén rögzített adattorról, mint primerről indított szintézissel, (3) denaturáció és a kovalensen nem kötött eredeti fragmentum eltávolítása.

A fluoreszcens színekkel megkülönböztetett terminátor nukleotidokat használó Sanger-féle ciklusos láncterminációs szekvenálást az Illumina cég NGS készülékei alkalmazzák. A szekvenálás tehát ezekben az eszközökben is szintézissel történik. A lánchosszabbítási lépésekben egyidejűleg mind a négy nukleotid jelen van, de minden ciklusban csak egy nukleotid épülhet be, mert a prekursorok a dezoxiribóz 3'-OH-n védőcsoportot tartalmaznak. A négyféle nukleotid a bázishoz kapcsolt fluoreszcens csoportok alapján optikailag megkülönböztethető. A mintaelőkészítés első lépése ebben a módszerben is adaptor és azonosító „barcode” részből álló oligonukleotid kapcsolása a fragmentált DNS végeire (1. ábra). Az adattorral ellátott fragmentumokat ezt követően átfolyó cella felületéhez

kapcsolják. A cella üvegbe mart, felületkezelt U-alakú vájat, aminek két végén történik a reagensek be-, illetve kiáramoltatása. A cella felülete akrilamiddal van bevonva, ehhez rögzített adaptor-komplementer oligonukleotidok biztosítják a fragmentumok kapcsolódását. Egyetlen négyzetmilliméter cella felület több százezer fragmentum kapcsolódását biztosíthatja. Már a kapcsolás és minden további lépés is a szekvenáló berendezésben történik. Ezek során először az átfolyó cella felületén rögzített fragmentumokat PCR reakcióval megsokszorozzák. Az ún. „bridge amplification” PCR reakcióban a fragmentumok két végére ligált kétféle adapter az átfolyó cella felületen váltakozva található adapter-komplementer oligonukleotidokkal hibridizálva biztosítja mindkét templát szál megsokszorozását. A sokszorozás eredményeként a cella egyes pontjain egy-egy fragmentum több százezer másolata alkot rögzített kettősszalú fragmentum csoportokat (klaszterek). A következő lépésben a duplaszalú DNS egyik láncát az adapterben tett hasítást követően denaturációval eltávolítják, a rögzítve maradt egyesszalú fragmentumhoz primert kapcsolnak és a lánchosszabbítások ciklikus lépései következnek. Ezek során nukleotid beépítés, a cella felület fluoreszcencia jeleinek optikai rögzítése, a védő és fluoreszkáló csoportok eltávolítása és újabb nukleotid beépítés lépések követik egymást 35-300 cikluson át. Az adaptorok és átfolyó cella megfelelő megválasztása, valamint a megfelelő minta előkészítés lehetővé teszi azt is, hogy a fragmentumok egyik végéről indított szekvenálás befejezése után eltávolítsák a szintézis terméket és a másik végről is szintézist végezzenek („paired end szekvenálás”). Ez fragmentumonként akár 2 x 300 nukleotid szekvencia meghatározását eredményezheti. A futások időigénye a ciklusok számától függően több nap lehet. Ez persze nem jelenti, hogy a használt enzimnek és reagenseknek ilyen hosszú élettartammal kell rendelkezni. A használt anyagok a készülék termosztált dobozában helyezkednek el közvetlen felhasználásukig. A leírt szekvencia meghatározási módszer előnye, hogy mivel egyszerre csak egy nukleotid beépítése történik, az ismétlődések nem okoznak hibát. Nukleotid kimaradás és fáziseltolódás előfordulhat azonban, ha egy védőcsoport vagy fluoreszcencia jelet adó csoport eltávolítása nem történik meg, vagy azok valamelyike a prekursoron nincs meg.

Az Illumina cég a különböző teljesítményre képes készülékek széles skáláját kínálja. Az adatbázisokban ma megtalálható szekvenciák többsége a HiSeq 2000 és 2500 használatával nyerték. A legújabb rendszer a HiSeq X Ten, amivel a cég számítása szerint valóban elérhető lesz az 1000 USD/genom költség még az eszköz amortizáció, reagens és munkaerő költségek figyelembevételével is. A több egységet tartalmazó rendszer egy-egy egysége háromnaponta 1,8 terabázis

(Tb) szekvencia adat termelésére képes. Az Illumina platformok „benjaminja” a MiSeq, ami egy futásban maximum 15 Gb szekvencia leolvasására képes. Ennek egy software-specifikus változata a klinikai alkalmazásra FDA jóváhagyást kapott MiSeqDx.

Szekvenálás protonfelszabadulás méréssel

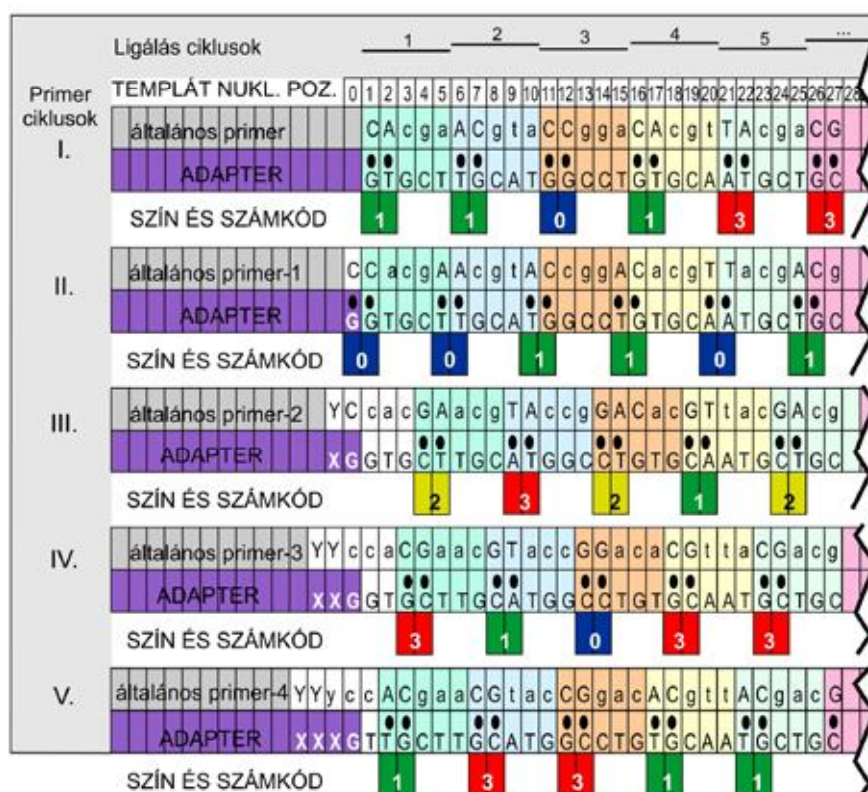
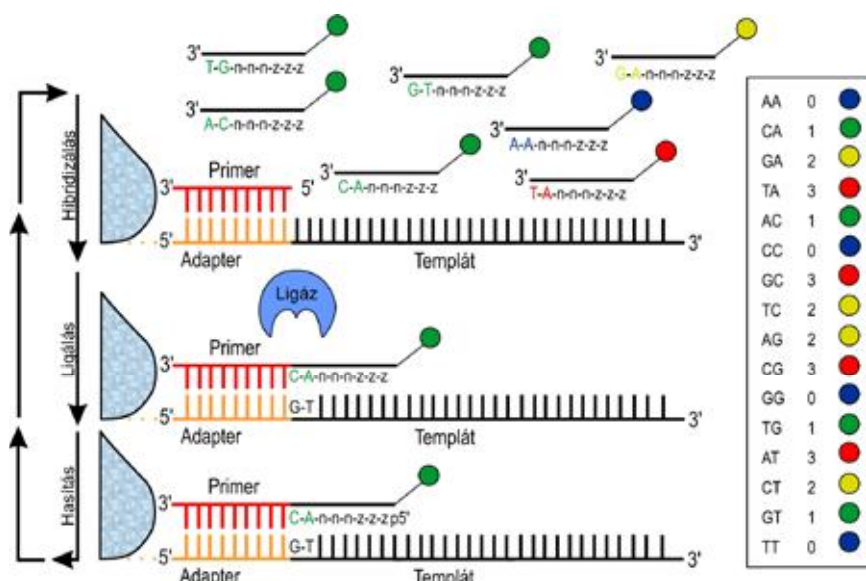
Szintézissel megvalósított szekvenálást végez a 2010-ben bemutatott Ion Torrent berendezés is. Ebben a szekvenálás a nukleotidbeépítéskor felszabaduló H^+ kimutatásán alapul. A könyvtár készítés első lépései ebben a módszerben is a DNS fragmentálása, fragmentum végek enzimes javítása és adaptorok ligálása. Ezt követően a fragmentumokat összekeverik felületükön adaptor-komplementer oligokat tartalmazó szemcsékkel, PCR reagensekkel és DNS polimerázzal. A szemcsék és fragmentumok helyes keverési aránya fontos, mert ezzel biztosítják, hogy a következő lépésben, amikor olajjal osszerázva a reakciót micellák képződnek, azok többsége csak egy szemcsét tartalmazzon, aminek a felületén egy DNS fragmentum kapcsolódott. A következő lépés PCR amplifikáció, aminek eredményeként minden templáton másolatok százezrei képződnek. Ezt követi az emulzió „feltörése”, az olaj eltávolítása és a DNS-t tartalmazó szemcsék összegyűjtése. A DNS-t tartalmazó szemcsékhez primert adnak és az Ion Chip zsebeibe helyezik. Ez egy specifikusan kialakított félvezető szilikon mikrochip. A chip felső rétege perforált szigetelő lemezke. Ennek felső felülete képezi egy áramlási cella alját, amiben a reagenseket mozgatják. A lyukak alsó részükkel H -ion érzékelőhöz csatlakoznak, ami a nukleotid beépítéskor felszabaduló proton koncentrációváltozást elektromos jelként érzékeli. A nukleotid prekursorokat egyenként folytatják át a chip felszínén. A jel erőssége arányos a nukleotid beépülések számával. A szekvenátor az adaptor nukleotidjai alapján kalibrálja az egyes zsebekre az egy nukleotid beépítéskor generált jelet (ez a fragmentumok számától, azaz a PCR amplifikációtól függ). A használt nukleozidtrifoszfátok nem hordoznak $3'$ védőcsoportot, ezért homopolimer részek előfordulásakor a több nukleotid beépülés eredményezte jel megfeleltetése a beépült nukleotidok számának hibás lehet. Ez a készülék hibaspektrumának döntő komponense. Az IonTorrent PGM készüléke a kisebb laborok számára is elérhető három benchtop készülék (PGM, GS Junior, MiSeq) egyike. Előnye a gyorsaság és viszonylag olcsó üzemelési költség. Számos helyen használják hazánkban is. Nagyobb testvére, a Proton most kezd megjelenni a hazai laboratórium(ok)ban.

Szekvenálás ligálással

A hibridizáció-ligálás ismétlésével végzett szekvencia meghatározás elvi alapja, hogy megfelelő körülmények biztosításakor a ligáz csak olyan szomszédos nukleotidok között alakítja ki a foszfodiészter kötést, amelyek tökéletesen illeszkednek templát párjaikhoz. Mivel automatizált szintézissel oligonukleotid keverékek egyszerűen előállíthatók és ezekben a sokféleség ellenére is egy-egy szekvencia bőven elegendő ahhoz, hogy a fluoreszcencia jele alapján detektálható legyen, a hibridizáció-ligálási módszerekben lényegében kiválogatják a vizsgált pontokon tökéletesen illeszkedő komplementer oligonukleotidokat. A templát az a molekula, amit vizsgálnak. A hozzákapcsolt adaptor az előbbi azonosítását, megsokszorozását és rögzítését teszi lehetővé, valamint primereket köt, amelyekkel a templáttal H-hidakat képző „vizsgáló” oligonukleotidokat (próbák) a ligáz kovalens kötéssel összekapcsolja. Ez utóbbiak a lehetséges szekvencia variánsok teljes spektrumát alkotják. Egyes tagjaik megkülönböztetése fluoreszkáló jelzéseik alapján történik.

2 bázis olvasás

Oligonukleotidok hibridizálásával és ligálásával végez nukleotidsorrend meghatározást az Applied Biosystems SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation and Detection) szekvenáló készülék. Ebben az eljárásban adaptorokkal ligált fragmentumokat kapcsolnak mágneses gyöngyökhöz, amelyek felületükön az adaptorokkal komplementer oligokat tartalmaznak. Emulziós PCR-rel amplifikálást végeznek, majd a gyöngyöket kovalens kötéssel egy speciálisan előkezelt üveglemez felületéhez kapcsolják, amit a szekvenáló átfolyó kazettájába helyeznek. Egyidejűleg két lemezt kezelnek, míg az egyikben a szekvenáló reagenseket folytatják át, a másiktól a jelet rögzítik. A szekvenálás lényegében ismételt ligálási ciklusokból áll. Minden ciklus 10-15 ligálási lépést tartalmazhat. Majd ezek ismétlése következik egy újabb primert használatával. Öt primer ciklusban, melyek mindegyikében egy-egy nukleotiddal megrövidített primert használnak (tehát 5-ször 10-15 ligálási ciklus eredményeként) fragmentumonként 50-75 nukleotid sorrendje határozható meg. A szekvenálási folyamat lépéseit a 2. ábra mutatja.



2. ábra. A szekvenálás ligálással SOLiD logika. A felső rész egy ligálási ciklus részletező bemutatása. A használt oktamer próba keverék néhány tagja és a 3' végi két nukleotidjuk szerinti színkód látható. Az egyszerűbb áttekintéshez, csak a zöld jelet hordozó próbákból szerepel mind a négy variáns (TG, AC, GT és CA), amelyekből a CA végű kapcsolható a példaként megadott templát szekvencián a primerhez. Az ábra alsó része szemlélteti, hogy a felső részen bemutatottak szerinti egymást követő ligálási ciklusok hogyan adnak információt az első primerrel az 1-2. és 6-7. és 11-12.... nukleotidokról. Ezt a részleges szekvencia információt a további primerekkel végzett ligálási ciklusok teszik teljessé, minden pozícióról kétszer nyerve szekvencia információt („2 base calling”).

A gyöngyök felületén rögzített fragmentumokhoz először az adapterrel komplementer primert adnak, aztán egy próba oligo keveréket és ligázt. Amelyik próba oligonukleotid 3' vége megfelel a primer 5' végével szomszédos nukleotidoknak, azt a ligáz odakapcsolja. Az oligonukleotid keveréket alkotó oligonukleotidok oktamerek. Az 3' végi két nukleotid egy kód szerint megfelel négy lehetséges fluorszcencia jel valamelyikének. A következő három pozícióban (3-4-5) bármely nukleotid előfordulhat. Ez tehát már önmagában 4^3 , azaz 1024 oligonukleotid variáció. A további három pozícióban is vannak eltérések, de ezekben a nem szokványos bázisok szerepe a fontos a hibridizáció erősítésére és az 5' végen a fluoreszkáló jelzés. Minden ligálási lépést követően rögzítik a színt a felület egyes pontjain. Ez a templát két nukleotidjáról ad információt („2-base calling”). A következő lépésben a hibridizáló oligonukleotidba épített módosított nukleotid mellett az 5. és 6. nukleotidok között kémiai hasítást végeznek és a próba oligo 6-7-8 nukleotidjait eltávolítják. A továbbiakban a meghosszabbított primert használva újra elvégzik a ligálási ciklust. Ez a 6. és 7. pozícióban elhelyezkedő nukleotidokról szolgáltat információt. 10-15 alkalommal elvégezve a ligálási ciklust így 50-75 nukleotidnyi részre kiterjedően nyerhető részleges szekvencia adat. Mivel a két utolsó nukleotid tizenhat variációban fordulhat elő, egy adott primer használatával az információ egy-egy hibridizációs lépés után nem egyértelmű. Azzá tehető azonban azzal, hogy egy-egy nukleotiddal elcsúsztatva a primert másik ligálási lépésekben újra információt nyernek a szomszédos nukleotidok alkotta párokról. A kívánt számú ligálási ciklus után tehát a primert egy nukleotiddal rövidebbel cserélik, és újra elvégzik a ligálási ciklusokat. Négy primer rövidítési lépéssel és primerekként 10-15 ciklust használva, 50-75 nukleotidnyi folyamatos szekvencia nyerhető. A SOLiD eljárás erőssége a „2 base calling”, ami jelentősen megnöveli a pontosságot. Hátránya azonban a rövid leolvasási hossz.

cPAL technika

Szekvenálás ligálással módszert alkalmaz a Polonator G.007 készülék (Compleat Genomics) is, de ebben egy-egy nukleotid leolvasása történik egy-egy ligálási lépésben. Újszerű a módszerben a templát készítése. A genom DNS-t ultrahangozással törlik, majd adaptorokat kapcsolnak hozzá, körre zárják, restrikciós enzimmel hasítják és újra adaptort ligálnak a végekhez majd újra körre zárják, míg kb. 400 bp-os cirkuláris molekulákat nyernek, melyekben négy különböző adaptor van. Ezeket a cirkuláris molekulákat PCR-rel felszaporítják, egy egymással összehurkolt molekulákból álló ún. nanoball (DNB) szerkezeteket kialakítva. A DNB-t olyan szilikon chipre kapcsolják, amelynek a felületén

rendezetten, egymástól mikrométer távolságra vannak DNS kötőhelyek. Egy helyre csak egy minta fragmentum tapadhat ki és rendezett elrendezés jön létre kis felületen. A DNS-hez 40-40 oligonukleotid alkotta keverékekkel végeznek hibridizációt és ligálást. A keverék elemeit alkotja minden adaptorhoz egy-egy komplementer szekvencia (8 db horgony: 4 adaptor mindkét oldalára 1-1) és minden horgony mellé 4-4 próba. A próbák négy különböző fluoreszkáló jellel jelöltek, az adapterekhez legközelebbi nukleotidok minősége szerint. Horgony és próba szekvenciákat kombináltan használva a keverékekben hibridizáció, ligálás, lemosás, hibridizáció, ligálás ismétlésével minden adaptor mellett egy rövid szekvenciárészlet meghatározható. (cPAL, combinatorial probe-anchor ligálás technika). Egy DNB-ről 62-70 nukleotid szekvencia olvasható. A módszer előnyei, hogy kicsi a hibalehetőség, mert ez nem láncreakció, ezért nem okoz hibát, ha egy lépés nem teljes. Továbbá olcsó is a módszer, mert a fragmentum elrendezés miatt kicsi a reagens igény. Három humán genom szekvenálása alapján számolva genomonként 4400 USD volt a költség. Az analízis 45-87-szeres lefedettséget és a genom szekvencia 86-95 %-át eredményezte. Hátránya azonban a módszernek, hogy a cirkularizációs lépések miatt egyes genom részek kimaradnak és a nagyon rövid leolvasások miatt (10 bp) a hosszabb ismétlődéseknél nem meghatározható a szekvencia.

Egy molekula szekvenálási módszerek

A módszerek, illetve platformok harmadik csoportjába az egy molekulán végzett szekvencia analízisről és az ilyen irányú próbálkozások egy részéről írok. Ezek vonatkozásában legkevésbé teljes az áttekintés, mert próbálkozások sokaságáról található többé-kevésbé részletes említés az irodalomban. E módszerek egy része valójában szintézissel megvalósított szekvenálás, de van közöttük a polinukleotid lánc bontásán alapuló és számos más módszer is, amelyek a DNS láncok nukleotid egységeinek „letapogatását” végzik.

Szintézis követése egyedi molekulákon, valós időben

Az egyedi molekulákon folyó szintézis valós időbeli követésén alapul (single-molecule real-time, SMRT) a Pacific Biosciences cég módszere. Az eljárás folyamatosan követi fluoreszcensen jelölt nukleotidok láncba építését a szekvenálandó DNS templát alapján. A szintézist Ø29 DNS polimeráz végzi egy speciálisan kialakított nanoszerkezetben (zero-mode waveguide, ZMW). Ezt üvegre helyezett vékony alumínium rétegbe (100 nm) képzett nanométeres nagyságrendű lyukak százezrei alkotják. Minden lyuk alulról gerjesztő lézerrel megvilágítható. A mérete miatt a lyukban a fény nem terjed, de az alsó

rétegben fluoreszcencia jel képződhet, ami érzékelhető. A méret és a geometriai elrendezés biztosítja, hogy az egymás melletti lyukakban történő gerjesztések eredményei külön-külön érzékelhetők. A minta DNS-t polimerázzal összekeverve helyezik el a százezernyi ZMW szerkezetet tartalmazó SMRT cellába úgy, hogy minden lyuk alján egyetlen molekula polimeráz rögzül. Egy lyukat így egy 20 zeptoliteres reakcióedénynek tekinthetünk. A szintézishez nukleozid-pentafoszfát szubsztrátokat használnak, amelyek a beépítéskor lehasadó részen hordozzák a spektrálisan megkülönböztethető jelzést. A beépülés érzékelését a nanoszerkezet elrendezés biztosítja: csak a beépülő nukleotid prekursora tartózkodik a lyuk alján a polimeráz aktív centrum közelében kellő hosszú ideig (ms) ahhoz, hogy érzékelhető fluoreszcencia jelet adjon. A minta előkészítéskor egy hairpin linkerrel összekapcsolva a dsDNS két szálát a fragmentum mindkét polinukleotidláncának szekvenciája olvasható (SMRTbell templat). A PacBio RS rendszert használták a Haiti kolerajárvány idején a kórokozó azonosítására. Öt baktérium törzs szekvenálását végezték el a berendezéssel. Az átlagos leolvasás hossz 700-1000 nukleotid volt, esetenként azonban 10.000 nukleotidos leolvasásokat is elértek. Az egyes leolvasások pontossága 81-83 % volt. Az egyedi leolvasások viszonylagos magas hibájának oka az, hogy esetenként egy perkurzor hosszabb ideig tartózkodik az aktív centrum közelében, de nem kerül beépítésre, vagy éppen fordítva, olyan gyorsan beépítésre kerül, hogy nem szolgáltat érzékelhető jelet.

Szintézis követése egyedi molekulákon, nem valós időben

Egyedi templat-molekulákon folyó szintézis követésével nyer szekvencia adatot a kevésbé elterjedt HeliScope készülék is. A készülék átfolyó cellába helyezett fedőlemezről készít fényképeket és rögzíti az egyedi molekulákon, egy-egy nukleotid addíciójával zajló szintézis lépéseit. A fedőlemez felületen vagy a templat fragmentumok vagy a primerek rögzítettek. Minden prekursor ugyanazzal a fluorofórral jelzett. Minden ciklus után fényképen rögzítik a beépülési helyeket a lemezen, majd eltávolítják a fluoreszkáló csoportot és új ciklust indítanak. A beszámolók szerint ez a módszer jó eredményt adott a fonalféreg genom szekvenálásával kipróbálva. Az átlagos leolvasások ugyan rövidek (> 25) voltak, és előfordultak hibák, a nagyszámú fragmentum olvasásával azonban nagy mennyiségű és jó minőségű szekvencia adat volt nyerhető (2,8 Gb).

Szekvenálás „nanopore” technológiával

A fejlesztés alatt álló DNS szekvencia meghatározásra szolgáló berendezések egy részének működési elve a nanométeres nyílású membránba ágyazott

csövecskéken (nanopore) áthaladó egyedi DNS molekulák által létrehozott változások kimutatása. Az áthaladó nukleotidok változásokat okoznak a póruson át zajló ionáramlásban, ami a pórust tartó membrán két oldalán mérhető. A nanopórusok biológiai vagy mesterséges anyagból kialakított, a dsDNS vastagságával összemérhető (4 nm) átmérőjű csövecskék. Fehérjéből és szerves anyagból képzett nanopórusokkal egyaránt folynak kísérletek. A legsikeresebben használt fehérje csatorna a *Staphylococcus* alfa-hemolizin (α HL) biológiai membránba építve. A szintetikus nanopórusokat szilikonból vagy más mesterséges anyagokból, pl. grafénból készítik. A csövecskéket membránba építik és a membrán által elválasztott térrész közötti ion elmozdulást érzékeny elektronikával mérik. Nehézséget okoz, hogy a bázisok hasonlósága miatt kicsi az egyes bázisok okozta különbség és viszonylag nagy az alapzaj. A leggyakrabban használt biológiai membránok vastagsága 5 nm, az ezekben kialakított csatorna tehát lényegesen hosszabb, mint két bázis távolsága (3,4 Å) a DNS-ben. Mivel 10-14 nukleotid elfér a csőben, az áram átfolyás blokkolásának mérésével lehetetlen egyedi bázis feloldást elérni. Nehézséget okoz a sebesség is, mert az elektroforézissel mozgatott DNS áthaladási sebessége (nukleotid/mikrosec nagyságrend) Mhz felbontású érzékelést kívánna. Ahhoz, hogy 120-150 mV potenciálnál, ami tekintettel a membrán vastagságára igen jelentős feszültségkülönbséget jelent, pA nagyságrendű áramjel legyen mérhető, az áthaladási sebességet le kell lassítani nukleotid/ms nagyságrendre. A szintetikus nanopórusok előnye, hogy kiküszöbölhető velük a biológiai lipid kettősréteg instabilitása és nehéz kezelhetősége. További előnyük, hogy könnyebben összekapcsolhatók párhuzamosan működő egységekké. Grafénnal végzett kísérletekben már sikerült 1-5 nm vastag, 5-10 nm hosszúságú csöveken DNS-t átvezetve áramingadozásokat kimutatni.

A „nanopore” technikával DNS szekvencia meghatározás eddig legeredményesebben az Oxford Nanopore MinION nevű eszközével sikerült. A 2014 februárjában tesztelt eszköz a „lab on a chip” technológia megtestesítője. Előállítói olcsó, a laboratóriumon kívüli környezetben is használható szekvenátornak szánják. Az eszközben baktériumban termelt alfa-hemolizin heptamerek alkotnak nanopórusokat. Minden nanopórushoz exonukleáz kapcsolt, és az egyenként levágott nukleotidok a csatornában ciklodextrinhez kötődnek (a módszer tehát tekinthető szekvenálásnak bontással). A nukleotid kötött állapotában történik az ionáram változás érzékelése. A négy nukleotid különböző mértékű áram változást okoz, ezért megkülönböztethető. Egy-egy nukleotid áthaladás 20 ms. Ezzel az áthaladási sebességgel a human genom

100.000 póruson egy óra alatt átjut, azaz leolvasható. A készülék, amelynek mérete egy csomag rágógumihoz hasonlítható, a közelmúltban tett próbák szerint még nem váltja be a várakozásokat, de figyelemre méltó eredményeket mutat. A kipróbálás két baktérium genomon történt. Az átlagos leolvasási hossz 5,4 kb volt és egyes olvasások elérték a 10 kb-t is. Teljes genomokat azonban még nem sikerült összerakni csak a MinION készülékkel szerzett adatok alapján.

Befejezésként még egy érdekes szekvenálási próbálkozást említek. Ebben optikai csipesszel rögzített polisztirol gyöngyökhöz rögzítik a DNS fragmentum végeit és RNS polimerázzal transzkripciót végeznek rajta. A nukleotidok beépítése konformáció változással jár, ami a DNS kismértékű torzulását okozza. Ez a polisztirol szemcse nagyságrendű, de jól érzékelhető elmozdulását eredményezi. A Sanger-féle láncterminációs módszer legkorábbi változatához hasonlóan, ha egyes reakciókban egy-egy nukleotid prekursor koncentrációja alacsonyabb, mint a többi, akkor a létrejövő elmozdulások ritmusa a szekvenciáról szolgál információt. A módszer kipróbálói 32 nukleotid olvasásakor 30-at helyesen azonosítottak.

Számos további DNS nukleotid sorrend meghatározási módszerrel tett próbálkozásokról található hír az irodalomban. Az ezekből származó megoldások talán a szekvenálás még újabb nemzedékeinek megszületését jelentik majd. Nehéz azt megjósolni, hogy melyik lesz tíz-tizenöt év múlva az uralkodó technika, és hogy miben lesz az közös a ma használtakkal. Az bizonyos azonban, hogy alkalmazásaikkal lehetőség nyílik majd a genetikai és epigenetikai különbségek feltárására egyedek és többsejtű szervezetek egyes sejtjei között is. Izgalmas még gondolni is arra, hogy ezzel mi mindenre nyerhetünk majd magyarázatot.

Köszönetnyilvánítás

Az összefoglaló elkészítését a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

- Mardis, R.E. (2013) Next-Generation Sequencing Platforms. *Annu Rev Anal Chem*, **6**: 287-303.
- Niedringhaus, P.T., Milanova, D., Kerby, M.B., Synder, M.P., Barron, A.E. (2011) Landscape of Next-Generation Sequencing Technologies. *Anal Chem*, **83**: 4327-4341.

Metzker, L.M. (2010) Sequencing Technologies – the next generation. *Nature Rev Gen*, **11**: 31-46.

Ansorge, J.W. (2009) Next- generation DNA sequencing Techniques. *New Biotech*, **25**: 195-203.



Boros Imre Miklós 1953-ban született Taktaharkányban. 1978-ben végzett a JATE biológus szakán. Ekkor már több éve diákkörös hallgatóként az SZBK-ban dolgozott Venetianer Pál csoportjában. 1985-ben szerzett kandidátusi fokozatot, 2000-ben MTA Doktora címet. Pályakezdésétől az SZBK Biokémiai Intézet munkatársa. 2002-től a Szegedi Egyetemen egyetemi tanára, jelenleg a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék és a Biológus Tanszékcsoport vezetője. Több alkalommal dolgozott hosszabb időn át az Egyesült Államokban (1986-89 NIH Cancer Institute, 1992-95 Case Western University, Medical School). Cancer Institute Oncology Research Faculty Development Award, Széchenyi Ösztöndíj, Szentágotthai Ösztöndíj, Straub plakett, Ipolyi Arnold Díj elismeréseket kapott. Érdeklődése a génműködés transzkripció szinten megvalósuló szabályozása, az utóbbi tíz évben munkacsoportja a kromatinszerkezet szerepét és epigenetikai hatásait vizsgálja.